

Aus der Eidgenössischen Milchwirtschaftlichen Versuchsanstalt Liebefeld-Bern
Direktor: Prof. Dr. P. Kästli

Versuche über die bakterizide Wirkung
von Rohmilch aus gesunden,
nicht infizierten Eutern

Inauguraldissertation

zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

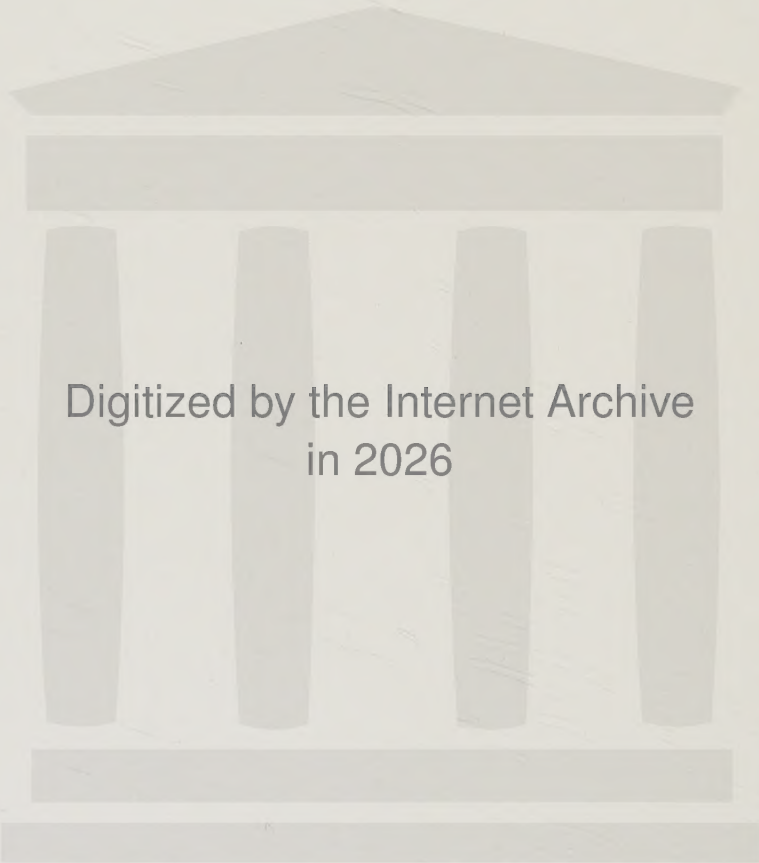
von

Kraft Meeder

aus Marktbreit/M

Vorgelegt über das
Institut für Nahrungsmittelkunde
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. L. Kotter

München 1964



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Eidgenössischen Milchwirtschaftlichen Versuchsanstalt Liebefeld-Bern
Direktor: Prof. Dr. P. Kästli

Versuche über die bakterizide Wirkung
von Rohmilch aus gesunden,
nicht infizierten Eutern

Inauguraldissertation

zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Kraft Meeder

aus Marktbreit/M

Vorgelegt über das
Institut für Nahrungsmittelkunde
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. L. Kotter

München 1964

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. L. Kotter
Referent: Prof. Dr. L. Kotter
Tag der Promotion: 28. 7. 1964



Veröffentlicht in der Zeitschrift
«Schweizerische landwirtschaftliche Forschung», Heft 4, 1964

D 19 (Tierärztliche Fakultät)

Versuche über die bakterizide Wirkung von Rohmilch aus gesunden, nicht infizierten Eutern

VON K. MEEDER

Eidgenössische Milchwirtschaftliche Versuchsanstalt Liebefeld-Bern
(Direktor: P. Kästli)

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	373
2. Literaturübersicht	374
2.1 Allgemeines	374
2.2 Art und chemische Zusammensetzung	374
2.3 Dauer und Aufbewahrungstemperatur	375
2.4 Individualität und Laktationsstadium	375
2.5 Futter	375
2.6 Hormone und Fermente	376
2.7 Krankheitsabwehrstoffe	376
2.8 Nährsubstrat	377
2.9 Anpassungsphase	377
2.10 Spezifität der Empfindlichkeit	378
2.11 Antibiotische Einflüsse	378
2.12 Die eigentliche Bakterizidie	378
3. Problemstellung	379
4. Eigene Versuche	380
4.1 Untersuchungsmaterial	380
4.1.1 Auswahl der Kühe	380
4.1.2 Bakterienstämme	380
4.2 Untersuchungsmethoden	380
4.2.1 Milchprobeentnahme	380
4.2.2 Milchuntersuchung	381
4.2.3 Prüfung des Keimwachstums	381
4.2.4 Auswertung der Ergebnisse	382
4.3 Vorversuche	382
4.3.1 Milchkontrolle der Kühe	382
4.3.2 Vergleichende Prüfung der Stämme	384
4.4 Hauptversuch	385
4.4.1 Das Verhalten verschiedener Stämme von <i>Str. lactis</i> in der Milch einzelner Kühe	386
4.4.2 Das Verhalten einzelner Stämme von <i>Str. lactis</i> in der Milch verschiedener Kühe	394
4.4.3 Zusammenstellung der Ergebnisse	398
5. Diskussion und Schlußfolgerungen	399
6. Zusammenfassung	402
7. Literaturverzeichnis	404

1. EINLEITUNG

Die Milch ist mit ihrem Gehalt an Zucker, Eiweiß, Mineralsalzen und Fett nicht nur ein hervorragendes Nahrungsmittel für den Menschen oder für das heranwachsende Tier, sondern auch ein sehr guter Nährboden für Kleinlebewesen. Die vielseitige Zusammensetzung und der hohe Nährstoffgehalt bieten die besten Voraussetzungen für die Keimvermehrung. Trotzdem mußte man immer wieder feststellen, daß die Bakterienzunahme in den ersten Stunden nicht mit der erwarteten Schnelligkeit vor sich ging. Vielfach schrieb man diese anfängliche Keimhemmung gewissen Schutzstoffen zu, welche in der Milch enthalten sein sollen. Diese Annahme lag nahe, weil analoge Versuche mit Blut, Schweiß, Speichel und Honig auch in diesen Stoffen keimhemmende Substanzen vermuten ließen. Die Wirkung solcher bakterientötender Substanzen nannte man Bakterizidie.

Es ist nicht leicht, diese bakterientötende Kraft abzutrennen von allen übrigen Einflüssen, welche das Bakterienwachstum verzögern. Von seiten der Milch aus kann eine Hemmung zustande kommen durch Stoffe, welche vom Futter oder aus dem Organismus übertreten, durch Immunkörper, die sich im Verlaufe von Infektionen bilden, oder durch Leukozyten, welche in normaler Milch in geringer, bei einer Euterreizung aber in großer Menge in das Sekret gelangen. Die Keimentwicklung kann aber auch deshalb gehemmt sein, weil eine gewisse Anpassungsphase an das neue Nährmedium nötig ist, bevor sich die Generationsdauer so weit verkürzt, daß die Neubildung von Keimen den normalen Abgang übertrifft. Bei einer Kontamination mit einer gemischten Keimflora ist zu erwarten, daß zuerst alle diejenigen Mikroben ausgeschaltet werden, denen das Nährmedium oder die Aufbewahrungstemperatur nicht zusagt, so daß sich daraus eine gewisse Keimverminderung ergibt.

Weiterhin ist anzunehmen, daß die verschiedenen Bakterienarten sich gegenseitig im Wachstum beeinflussen, und daß Bakteriophagen gewisse Keimarten beeinträchtigen.

Wenn experimentell festgestellt werden soll, ob normalerweise in der Milch spezifisch bakterienfeindliche Substanzen enthalten sind, so müssen alle diese sekundären Faktoren ausgeschaltet werden.

Die Frage nach der eigentlichen Bakterizidie der Milch ist für die Praxis von wesentlicher Bedeutung, weil der Bakteriengehalt ein wichtiges Qualitätsmerkmal sowohl für die Trinkmilch, als auch für den Rohstoff zur Verarbeitung auf Käse, Butter und Milchspezialitäten ist. Eine minime Keimzahl kann zwar durch sofort an das Melken anschließende Tiefkühlung sichergestellt werden. Für kleinere und mittlere Produktionsbetriebe ist aber die künstliche Kälte so teuer, daß sie den Produzentenpreis der Milch zu stark belastet. Wenn wenigstens in den ersten Stunden nach dem Verlassen des Euters bakterizide Kräfte in der Milch

die Keimentwicklung unterbinden, so wäre eine Tiefkühlung, die einige Stunden später erfolgt, genügend, um eine Keimvermehrung auszuschließen. Die Einsammlung von Milch aus größeren Gebieten in zentrale Sammelstellen mit Kühlanlagen wäre deshalb möglich, ohne daß eine Qualitätsschädigung in Kauf genommen werden müßte.

Die Frage der Bakterizidie erhält aber auch deshalb ein besonderes Gewicht, weil mehr und mehr Betriebe infolge des Personalmangels von der täglich zweimaligen Milcheinlieferung in eine Sammelstelle abgehen müssen. Bisher war das in der Schweiz nur ausnahmsweise der Fall, und das Schweizerische Milchlieferungsregulativ schrieb für solche Fälle ausdrücklich vor, daß die Milch des Abend- und des Morgengemelkes in separaten Gefäßen abzuliefern sei. Man will damit verhüten, daß die 12stündige vorgekühlte Milch noch einmal aufgewärmt werde, weil man fürchtet, dadurch das Keimwachstum neu und intensiv in Gang zu bringen. Sind aber bakterizide Kräfte in der Milch genügend stark wirksam, dann müßte es umgekehrt vorteilhafter sein, mit dem Zufügen von frischer und demnach stark keimhemmender Milch, die Bakterienentwicklung von neuem zurückzuhalten.

Im Rahmen eines weiter gespannten Versuchsprogrammes sollen zur Klärung dieser praktisch bedeutsamen Fragen an der Anstalt Liebefeld einige Probleme der Bakterizidie näher beleuchtet werden. Die vorliegende Arbeit ist ein Teilstück dieser Forschung.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 ALLGEMEINES

Die ersten Angaben über die Bakterizidie der Milch stammen von FOKKER [1], welcher im Jahre 1890 beobachtet hat, daß in frischer Ziegenmilch sich Milchsäurebakterien wider Erwarten nicht vermehrten, sondern sogar völlig abstarben. FREUDENREICH [2] hat ähnliche keimfeindliche Eigenschaften der Molke festgestellt. Er ist der Ansicht, daß diese Kräfte so lange wirksam sind, als das Leben in der Milch weiterwirke. Bereits im Lehrbuch von FLEISCHMANN [3] wird aber darauf hingewiesen, daß andere Forscher eine Bakterizidie der Milch im engeren Sinne nicht bestätigen können.

2.2 ART UND CHEMISCHE ZUSAMMENSETZUNG

Über die Art und die chemische Zusammensetzung allfälliger Hemmstoffe ist nicht viel bekannt. AUCLAIR [4] unterscheidet zwischen dem Laktenin 1, das vor allem im Kolostrum vorkommt, und dem Laktenin 2, welches von PORTMANN [5] als identisch mit der Peroxydase erkannt wurde. SASAKI [6] hat durch Ultra-

zentrifugation und mit einem Azetonauszug Hemmstoffe anreichern können. Angaben über den chemischen Aufbau solcher Hemmstoffe haben wir in der Literatur nicht gefunden.

2.3 DAUER UND AUFBEWAHRUNGSTEMPERATUR

Die Dauer der sogenannten Bakterizidie ist offensichtlich abhängig von der Aufbewahrungstemperatur. In dieser Beziehung sind sich alle Autoren einig. Im übrigen weichen aber die Angaben außerordentlich stark voneinander ab. RITTER [7] zitiert MEIER [8], welcher bei 14 °C eine Bakterizidiewirkung während 18–21, bei 19 °C während 7–8 und bei 30 °C eine solche während 5 Stunden beobachtet hat. Bei 37 °C war sie auf 3 Stunden verkürzt. HIPPIUS [9] spricht von 6–7 evtl. 12–18 Stunden. SZASZ [10] gibt deren Dauer mit 24 Stunden an. Nach RULLMANN [11] soll sie 5 Tage lang andauern. SCHLÄPPI [12] und HOFFMANN [13] haben sogar nach Aufbewahrung während 3–6 Monaten noch Bakterizidie festgestellt. Am andern Extrem liegen die Angaben von CHAMBERS [14], der bei Colibakterien eine Keimhemmung nur während 2 Stunden feststellte. SCHLÄPPI und HOFFMANN nehmen – sicher mit Recht – an, daß bei kühler Aufbewahrungstemperatur mesophile Bakterien sich nicht entwickeln können und deshalb allmählich zugrunde gehen. SASAKI [6] fand, daß bei einer Aufbewahrung der Milch während 20 Minuten bei 38 °C, die Hemmung von *Streptococcus pyogenes* verstärkt wurde. Verschiedene Autoren, so ZOLLIKOFER [12] und GILLIES [16], stellten fest, daß die Erhitzung der Milch das Bakterienwachstum fördere. In sterilisierter Milch vermehren sich die Bakterien hemmungslos, während die Pasteurisation nach den Untersuchungen von KÄSTLI und BINZ [17] keine wesentliche Verbesserung für das Bakterienwachstum erbringt.

2.4 INDIVIDUALITÄT UND LAKTATIONSSTADIUM

Von verschiedenen Autoren wird übereinstimmend berichtet, daß die Individualität und das Laktationsstadium der Kühe einen deutlichen Einfluß ausüben auf die Wachstumsbedingungen der Milchbakterien. AUCLAIR fand im Kolostrum das Laktenin 3 und deshalb eine stärkere Keimhemmung als in der Normalmilch. Nach RITTER ist das Wachstum von Milchsäurebakterien am Ende der Laktation etwas besser.

2.5 FUTTER

Vielfach wird berichtet, daß Hemm- oder Wuchsstoffe aus dem Futter in die Milch übertreten und das Bakterienwachstum beeinflussen. So sollen nach VIRTANEN [40] aus Knoblauch- und Zwiebelgewächsen antibakterielle Substanzen

in die Milch übergehen. Nach CIBLIS [18] wirkt der von der Fütterung abhängige Menadiongehalt deutlich auf Säurebakterien, weniger aber auf coliarartige und auf Proteolyten. RITTER [7] führt verschiedene Autoren an, welche der Fütterung der Milchtiere einen wesentlichen Einfluß auf das Keimwachstum in deren Milch zuschreiben, sich untereinander aber oft widersprechen. Er selber, wie auch McEWEN [19], kommen zur Ansicht, daß die Fütterung ohne wesentlichen Einfluß ist.

2.6 HORMONE UND FERMENTE

Es besteht auch die Möglichkeit, daß aus dem Stoffwechsel der Milchkuh Hormone oder Fermente übertreten, welche das Keimwachstum in der Milch beeinträchtigen. Nach LESTER [20] vermag im besonderen das Desoxykortikosteron gram-positive Bakterien, Schimmel und Hefen zu hemmen. Nach MAXCY [21] hemmt die Caprinsäure das Keimwachstum vollständig. Diese, wie auch andere freie Fettsäuren, treten in der Milch auf, wenn infolge einer hormonalen Störung der Kuh das Milchfett fermentativ gespalten wird.

2.7 KRANKHEITSABWEHRSTOFFE

Verschiedene Autoren sind der Frage nachgegangen, ob Krankheitsabwehrstoffe, Leukozyten oder Immunkörper, die bei Euterreizungen oder nach durchgemachten Infektionskrankheiten in der Milch auftreten, einen Einfluß ausüben auf das Keimwachstum. WHITEHEAD [22] fand eine schlechte Säurebildung in Milch mit einem Leukozytengehalt von über 5 Mio/ml. DREWES [23] und SHAYEGANI [24] kommen zur Ansicht, daß der Leukozytengehalt ohne Einfluß sei auf die Keimentwicklung. Die Frage nach der Einwirkung von serologischen Immunkörpern ist wenig bearbeitet. SCHLÄPPI [12] und HOFFMANN [13] nehmen zwar an, daß es vor allem Immunstoffe seien, welche die Bakterizidie bedingen, geben aber dafür keine näheren Angaben. PORTMANN [25] konnte durch Impfung von Tieren mit Milchsäurestreptokokken Hemmstoffe im Blut und zum Teil in der Milch erzeugen und kommt zur Ansicht, daß die Laktenine 1 und 3 nach AUCLAIR Agglutinine seien gegen verschiedene sensible Stämme von *Streptococcus cremoris*.

Verschiedene Autoren sind ganz allgemein der Ansicht, daß kranke Milch speziell die Säuerung hemme. RITTER [7] zitiert LEITCH [26], der bereits mit einem Zusatz von 0,1% kranker Milch eine Hemmwirkung zustande brachte, sowie PROUTY [27], der 10% Mastitismilch dazu nötig hatte und selber der Ansicht ist, daß Mastitismilch das Keimwachstum positiv oder negativ beeinflussen könne. Nach PETER und WHITEHEAD führt kranke Milch zu Betriebsstörungen, wegen gestörter Säuerung. Über die bakterizide Wirkung von kranker Milch

gegen Mastitiserreger liegen widersprechende Berichte vor. GRABER [28] fand eine deutliche Hemmung der Mastitiserreger in krankhaft veränderter Milch. SEELEMAN und MURPHY [29] fanden spezifische Hemmstoffe, was McEWEN [19] nicht bestätigen konnte.

2.8 NÄHRSUBSTRAT

Verschiedene Forscher gingen von der Annahme aus, daß die Keimhemmung der Anfangszeit einfach darauf zurückgehe, daß die Rohmilch und im besonderen deren unveränderte Eiweißstoffe ein für viele Bakterien schlecht geeignetes Nährsubstrat darstellen. HENNINGSON [30] hat dazu festgestellt, daß die Denaturierung des Albumins und das Auftreten von freien SH-Gruppen das Keimwachstum wesentlich fördere. Darauf mag das unterschiedliche Wachstum von Keimen in roher und erhitzter Milch, das immer wieder festgestellt worden ist, zurückzuführen sein.

2.9 ANPASSUNGSPHASE

Einen weiteren Grund für die anfängliche Abnahme der Keimzahl sucht man in einer gewissen *Anpassungsphase*, welche die Bakterien durchmachen müssen, wenn sie aus einem anderen Nährmilieu in die Milch gelangen (STOCKING und BARTELLI zitiert nach FLEISCHMANN [3]). Demgegenüber konnte GRABER [28] feststellen, daß bei den aus infizierten Eutern und aus Melkverunreinigungen stammenden Mikroorganismen, das heißt bei bereits mehr oder weniger adaptierten Keimen, eine bakterizide Phase nicht bestehe.

Analog fanden NATARAJAN und DUDANI [31] weder in Kuh- noch in Büffelmilch eine gehemmte Vermehrung von *Streptococcus thermophilus*, *Micrococcus caseolyticus* und *Bacillus cereus*.

BUCHANAN [32] nennt folgende Wachstumsphasen, die bei Bakterizidieversuchen zu berücksichtigen sind.

1. Stationäre Phase, konstante Bakterienzahl.
2. Träge Wachstumsbeschleunigung.
3. Logarithmische Wachstumsphase mit konstanter Generationszeit.
4. Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit. Die Generationsdauer verlängert sich.
5. Stationäre Phase. Das Absterben und die Neubildung von Bakterien halten sich die Waage.
6. Phase des beschleunigten Todes. Die Bakterienzahl nimmt zuerst langsam, dann mit zunehmender Schnelligkeit ab.
7. Logarithmische Todesphase. Die Absterbebeschwindigkeit ist konstant.

2.10 SPEZIFITÄT DER EMPFINDLICHKEIT

Die Anpassungsfähigkeit der einzelnen Bakterienarten mag wesentlich beteiligt sein an der von verschiedenen Seiten hervorgehobenen Spezifität der Empfindlichkeit verschiedener Bakterienarten, auf welche RITTER [7], NATARAJAN [31] und KOSIKOWSKI [32] hinweisen. Innerhalb derselben Bakterienart werden einzelne Stämme als spezifisch empfindlich geschildert von KOSIKOWSKI [32]; von HEINEMANN und DREWES (zitiert nach RITTER [7]). Gestörte Vermehrungsverhältnisse stellte auch LABOTS [34] fest, welcher mit Reinkulturen von Colibakterien arbeitete, die die Erhitzung auf 71 °C während 5 Minuten überstanden hatten. Er erhielt nur bei einer massiven Einimpfung eine Vermehrung in der Rohmilch. KOCK [35] betrachtet die anfängliche Keimverminderung als natürliches Absterben einer Zellpopulation und nimmt an, daß dadurch für die jungen Zellen Wuchsstoffe geliefert würden.

2.11 ANTIBIOTISCHE EINFLÜSSE

Eine wesentliche Rolle spielen bei der unter praktischen Verhältnissen immer vorhandenen Mischflora die antibiotischen Einflüsse. Auf dieses komplexe Gebiet weist namentlich RITTER [7] hin. Ähnliche Einwirkungen sind von Bakteriophagen zu erwarten. SONNENSCHN [36] hat nachgewiesen, daß solche vor allem mit dem Kuhkot in die Milch gelangen.

2.12 DIE EIGENTLICHE BAKTERIZIDIE

Um alle die sekundären Einflüsse auf das Keimwachstum auszuschalten und die eigentliche Bakterizidie der Milch zu erfassen, ist es nötig, keimfreie, gesunde Milch von verschiedenen gefütterten Kühen in allen Laktationszeiten mit Reinkulturen zu beimpfen, die bereits auf Milch adaptiert sind. In diesem Sinne stellt bereits LÖHNIS [37] für Bakterizidieversuche folgende Ansprüche:

1. Die in die Frischmilch eingeimpfte Keimzahl darf nicht zu hoch sein, weil bei zu großer Bakterienzahl eine gegenseitige Keimhemmung eintritt.
2. Es sollen Reinkulturen verwendet werden, damit eine wechselseitige Beeinflussung der Keime vermieden wird.
3. Die Keime sollen nicht aus der Ruhe überimpft werden, weil sonst bis zum Angehen des Wachstums eine gewisse Latenzzeit verstreicht.

Diese strengen Versuchsbedingungen sind in den bisherigen Arbeiten nicht durchwegs eingehalten worden.

Im Rahmen eines weiteren Versuchsprogrammes befaßt sich die Anstalt Liebefeld seit einiger Zeit mit der Erforschung der eigentlichen Bakterizidie. WAL-

SER [38] hat einige in der Milchwirtschaft wichtige Bakterienarten, nämlich *Streptococcus lactis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* und *Aerobacter aerogenes* an Frischmilch, sterile Pulvermilch und Bouillon adaptiert und geprüft, wie die Vermehrung weitergeht, wenn diese Keime auf dem gleichen oder auf einem der andern Nährböden weiterverimpft werden. Er versuchte derart vor allem abzuklären, ob eine Umstellung im Nährsubstrat regelmäßig eine anfängliche Keimhemmung zur Folge habe und im besonderen, ob bakterizide Kräfte in der Frischmilch vorhanden seien, welche auch das Wachstum bereits adaptierter Keime zu hindern vermögen. Er stellte dabei fest, daß sterile Pulvermilch und Bouillon für die verwendeten Keimarten derart gute Wachstumsbedingungen bieten, daß eine Adaptionsphase auch bei der Übertragung aus einer andern Nährflüssigkeit nicht eintrat. Dagegen ergab sich regelmäßig eine Wachstumshemmung bis zu 2 ½ Stunden, wenn die Keime aus Bouillonkulturen auf Frischmilch überimpft wurden. Eine solche Adaptionsphase fiel aber in den meisten Fällen aus, wenn bereits an Rohmilch gewöhnte Keime in die Frischmilch gegeben wurden. Aus seinen Versuchen konnte WALSER die Schlußfolgerung ziehen, daß eine bakterizide Substanz in der Roh- und Frischmilch nicht nachweisbar war, sondern daß die Keime nur eine gewisse Zeit nötig hatten, um sich der neuen Umgebung anzupassen. WALSER hat für seine Versuche nur *eine* Kuh verwendet und nur 1–2 Stämme der verschiedenen Bakterienarten. Er hat ferner keinen Vergleich darüber angestellt, ob das Wachstum der Bakterien in frischer oder aufbewahrter und damit in ihrer Bakterizidie herabgesetzte Rohmilch unterschiedlich verlaufe. Es ist die Aufgabe der vorliegenden Arbeit, diese noch offenen Fragen zu klären.

3. PROBLEMSTELLUNG

Für die Bakterizidieversuche wurden mehrere Kühe ausgewählt, welche keimfreie und gesunde Milch geben. Da alle diese Kühe bei gleicher Haltung und Fütterung stehen, sind Einflüsse von dieser Seite her nicht berücksichtigt. Dagegen sind Kühe in verschiedenen Laktationsstadien in den Versuch einbezogen worden. Als Testbakterien wurden die für die Haltbarkeit der Milch bedeutsamen Laktis-Streptokokken ausgewählt. Als erstes stellen wir uns dabei die Frage, ob verschiedene Stämme dieser Keimart wesentlich verschiedene Wachstumsverhältnisse in Pulvermilch¹ zeigen, um artgebundene Differenzen in der Generationsdauer nachzuweisen. Anschließend soll in der gesunden und keimfreien Milch mehrerer Kühe die Keimentwicklung der verschiedenen Stämme geprüft werden. Um festzustellen, ob eine anfängliche Hemmung in der Wachstumsgeschwindigkeit auf bakterizide Kräfte der frischen Milch zurückgehe, wird im Parallelversuch immer keimfreie Rohmilch derselben Kuh verwendet,

¹ Sterile Lösung von Milchpulver.

welche zur Abschwächung der der Frischmilch zugeschriebenen Bakterizidie während 24 Stunden aufbewahrt war. Durch Verwendung verschiedener Kühe und mehrerer Stämme soll abgeklärt werden, ob die Bakterizidie eine Angelegenheit der Individualität der Kuh sei, oder ob eventuell nur einzelne Bakterienstämme auf keimhemmende Kräfte der Frischmilch mehr oder minder stark ansprechen.

4. EIGENE VERSUCHE

4.1 UNTERSUCHUNGSMATERIAL

4.1.1 Auswahl der Kühe

Für die Untersuchungen auf Bakterizidie mußten wir Milch haben, welche möglichst keine Immunstoffe und wenig Leukozyten enthielt und auch von krankhaften Beimischungen frei war, um auszuschließen, daß das Keimwachstum dadurch beeinflußt werde. Ferner mußte die Milch vom Euter weg keimfrei sein, weil wir das Wachstum von Reinkulturen beobachten wollten. Zur Verfügung standen uns die Kühe des Gutsbetriebes Liebfeld.

4.1.2 Bakterienstämme

Weil das Hauptgewicht der vorliegenden Arbeit auf der Prüfung von möglichst verschiedenen Stämmen einer Bakterienart liegt, wählten wir den für die Milchsäuerung in der Praxis wichtigen *Streptococcus lactis*. Aus der Sammlung der bakteriologischen Abteilung der Versuchsanstalt wählten wir die sechs Stämme mit den Nummern 1194, 1266, 1268, 1503, 1604, 1605 aus, welche in unserer Arbeit in dieser Reihenfolge mit den römischen Ziffern I–VI bezeichnet sind.

4.2 UNTERSUCHUNGSMETHODEN

4.2.1 Milchprobeentnahme

Die Proben wurden am Nachmittag vor Beginn der Stallarbeiten entnommen. Damit konnten Kontaminationen mit Stallstaub-Bakterien weitgehend vermieden werden. Mit einem sauberen Tuche wurde das Euter gründlich gereinigt, dann die Zitzenöffnung und ihre Umgebung mit einem Wattebauschen, der mit einem Äther-Alkohol-Gemisch (20/80%) angefeuchtet war, gesäubert. Der erste Milchstrahl wurde auf das Indikatorpapier oder in ein separates Gefäß abgemolken, um allfällige Bakterien aus dem äußeren Teil des Strichkanales wegzuspülen. Für die Milchuntersuchung wurden 40 ml in ein steriles Probeglas, für die Keimzahlbestimmungen 480 ml in eine Nährbodenflasche von 500 ml Inhalt gemolken. Das Gefäß war vor und nach der Probefassung mit einem sterilen

Wattebauschen verschlossen. Die Probegefäße wurden beim Melken möglichst waagrecht gehalten, um eine Verschmutzung durch Stallstaub und herabfallende Hautschuppen oder Schmutzpartikel zu vermeiden. Es wurde möglichst mit der vollen Faust gemolken. Erstlingskühe mußten ab und zu gestrippt werden.

4.2.2 *Milchuntersuchung*

Im Stall wurde mit dem Bromthymolblau-Indikatorpapier das pH der Milch geprüft.

Laugeprobe: Zur Erkennung von krankhaft veränderter Milch wurden je 3 Tropfen Milch auf einer schwarzen Glasplatte mit 1 Tropfen n-Natronlauge während 30 Sekunden gründlich durchmischt. Das Auftreten von Flocken wurde als krankhaft taxiert.

Schalmtest: 4 Tropfen einer 4%igen Lösung von Alkyl-Aryl-Sulfonat mit einem Zusatz von je 2 ml 3%igem alkoholischem Bromthymolblau und 30%igem Wasserstoffsuperoxyd auf 100 ml destilliertes Wasser wurde auf einer weißen Kunststoffplatte mit 3 Tropfen Milch versetzt und gründlich durchmischt.

Mit dieser Modifikation des Schalmtestes lassen sich das pH der Milch an der Färbung des Indikators, die Zellvermehrung und Veränderung der Eiweißstoffe an der Gelierung und die Katalasewirkung am Auftreten einer durch das Netzmittel stabilisierten Schaumkrone erkennen.

Die Katalase-Thyromol-Probe wurde nach ROEDER ausgeführt.

Die Zellzahlbestimmung erfolgte nach BREED mit der Färbung nach BROADHURST.

Die Prüfung auf Euterinfektion erfolgte nach STECK. Nachgewiesene Euterkeime wurden auf der Blutplatte auf Wachstumsart und Fähigkeit zur Hämolyse mit und ohne Betatoxin (CAMP-Test) kontrolliert.

4.2.3 *Prüfung des Keimwachstums*

Die aus den gesunden und keimfreien Eutern oder Eutervierteln entnommenen Milchproben wurden entweder in der ersten halben Stunde als *Frischmilch*, oder aber nach einer Aufbewahrung während 24 Stunden im Kühlschrank als *aufbewahrte Rohmilch* mit den Teststämmen beimpft, gründlich durchmischt und anschließend in sterile Gläser zu 10 ml abgefüllt, so daß für die zu verschiedenen Zeiten durchgeführten Keimzahlbestimmungen immer ein Reagenzglas verwendet werden konnte.

Die verschiedenen Bakterienstämme wurden aus der Vorratskultur zuerst auf Pulvermilch überimpft, um sie in die Entwicklungsphase zu bringen. Nach einer Bebrütung während 14 Stunden bei 30°C standen sie als Ausgangskulturen bereit. Daraus wurde die gewünschte Menge in aufbewahrte Rohmilch übertragen und bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase bebrü-

tet. Von hier aus wurden die Keime parallel in Frischmilch und Rohmilch überimpft.

Die Keimzahlbestimmung erfolgte durch Anlegen von Plattenkulturen, wobei als Nährboden Plate Count Agar (Difco) diente. Die Keimzahlbestimmung wurde nach der FIL-Standard-Methode [39] durchgeführt:

Von der gut durchmischten Milchprobe wird 1 ml zu 9 ml physiologischer Kochsalzlösung gegeben. Nach gründlicher Durchmischung wird diese Verdünnungsreihe weitergeführt. Aus je drei aufeinanderfolgenden Verdünnungen wird mit sterilen Pipetten je 1 ml in sterile Petrischalen gegeben.

Schließlich werden aus einem Reagenzglaschen ca. 10 ml verflüssigten und auf 43 °C abgekühlten Agars in jede Petrischale gegossen, gründlich vermischt, erstarren gelassen und 72 Stunden bei 30 °C bebrütet.

Ausgezählt werden die Platten mit Koloniezahlen im Bereich von 20–200 und das Ergebnis mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

4.2.4 Auswertung der Ergebnisse

Die ermittelten Keimzahlen wurden in Tabellen übertragen; daraus konnte dann eine Graphik erstellt werden. Die Werte der Wachstumskurven wurden logarithmisch aufgetragen.

Für jeden Versuch wurde eine eigene Graphik erstellt, in der die Wachstumskurven von Roh- und Frischmilch gegenübergestellt werden.

4.3 VORVERSUCHE

4.3.1 Milchkontrolle der Kühe

Die Milch der 13 melken Kühe des Gutsbetriebes wurden nach den oben geschilderten Methoden geprüft. Für die Keimwachstumsversuche verlangten wir Milch mit folgenden Eigenschaften:

1. Indikator-, Lauge- und Schalmprobe: negativ.
2. Sedimentprobe: unter 2‰ weißes Sediment.
3. Katalase-Thybro-mol-Probe: Gasbildung weniger als 20 ml pro 100 ml Milch nach 3 Stunden bei Zimmertemperatur. Farbe: gelbgrün (pH ca. 6,6).
4. Zellzahl nach BREED-BROADHURST: unter 100 000 pro ml.
5. Kultur nach STECK: nach 36 Stunden Bebrütung bei 38 °C negativ, das heißt weniger als 2 Keime pro ml.

Von den 13 untersuchten Kühen entsprach die Milch nur bei zweien an allen vier Vierteln diesen strengen Anforderungen. Bei weiteren drei Kühen konnte die Milch einzelner Viertel für unsere Zwecke verwendet werden. Es handelt sich dabei um die folgenden Kühe:

Nr.	Kuh Name	Geboren	Gekalbt	Belegt	Viertel
4	Stella	1960	11. 63	1. 64	alle Viertel
20	Scheck	1949	4. 63	nicht belegt	alle Viertel
5	Krone	1951	11. 62	7. 63	HL + HR
15	Miggi	1950	11. 62	2. 64	HR, VL + VR
13	Blanka	1960	1. 8. 63	31. 8. 63	HR + VL

Wir hatten damit Versuchskühe in verschiedenem Alter und in jedem Laktationsstadium. Den drei Kühen im Alter von 13 bis 15 Jahren standen zwei junge Tiere von je 4 Jahren gegenüber. Die drei Kühe Miggi, Scheck und Krone waren zur Zeit der Versuche ausgesprochen altmelk, die Kuh Stella war neumelk und die Kuh Blanka war im mittleren Laktationsstadium. Die Versuche wurden durchgeführt in der Zeit von Mitte Januar bis Mitte Februar 1964. Die Versuchstiere erhielten alle das gleiche Futter, nämlich pro Tier und Tag 8–15 kg Heu und 15 kg Rüben, dazu 2–4 kg eines Kraftfuttermischs, bestehend aus 4 Teilen Gerste, 2 Teilen Hafer, 2 Teilen Mais und 2 Teilen Erdnußmehl und ca. 50 g Salz. Haltung und Fütterung waren somit bei allen Versuchstieren die gleichen.

Die Euter- und Milchkontrolle wurde bei Beginn der Versuche am 15. Januar durchgeführt und vor dem Abschluß am 12. Februar nochmals wiederholt. Die Zellzahlbestimmungen ergaben dabei folgende Werte:

			15. 1. 1964 Zellzahl/ml	12. 2. 1964 Zellzahl/ml
I	Stella	HL	20 000	60 000
		HR	10 000	40 000
		VL	40 000	50 000
		VR	10 000	30 000
II	Scheck	HL	90 000	50 000
		HR	100 000	70 000
		VL	70 000	50 000
		VR	60 000	70 000
III	Krone	HL	10 000	20 000
		HR	10 000	20 000
		VL	100 000	80 000
		VR	50 000	30 000
IV	Miggi	HL	90 000	60 000
		HR	80 000	40 000
		VL	80 000	30 000
		VR	90 000	30 000
V	Blanka	HL	120 000	20 000
		HR	70 000	20 000
		VL	60 000	20 000
		VR	70 000	30 000

Auch die übrigen Untersuchungsmethoden ergaben durchwegs normale Resultate.

Daraus geht hervor, daß es nicht leicht war, Tiere zu finden, die den strengen Anforderungen genügten.

Gesunde Tiere mit gesunden Eutern wären relativ viele vorhanden gewesen. Bei einer großen Anzahl davon war aber das Euter mit irgendeinem Erreger latent infiziert.

4.3.2 Vergleichende Prüfung der 6 *Str. lactis*-Stämme

Zur Einarbeitung in die Methodik wurde eine Reihe von Vorversuchen durchgeführt.

Vor allem mußten wir die Generationsdauer der verwendeten Keime kennenlernen und damit die nach einer bestimmten Bebrütungsdauer erreichte Keimzahl, um die entsprechenden Verdünnungen wählen zu können.

Es wurde sterile Pulvermilch mit den Teststämmen *Str. lactis* I–VI 14 Stunden bei 30°C bebrütet, dann 10000fach in Pulvermilch verdünnt, wiederum bei 30°C bebrütet und halbstündlich daraus auf Agar-Plattenkulturen angelegt.

Vorversuchsergebnisse

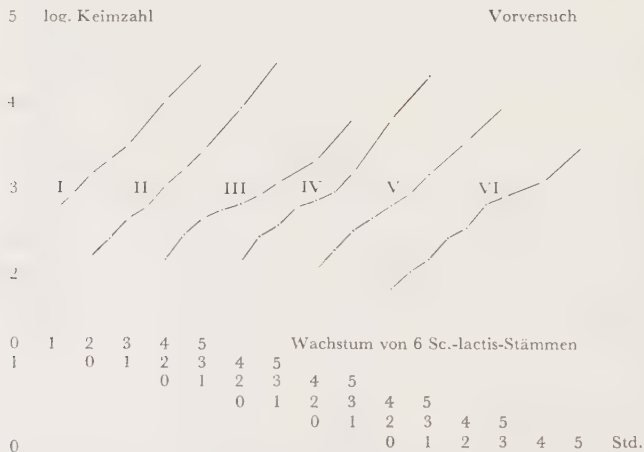
Versuch 1: 20/21.4.1964

Teststämmen: *Str. lactis* I–VI

Bebrütung: 14 Stunden bei 30°C

Beimpfungsverdünnung: 10^{-4}

Keimvermehrung bei 30°C während 5 Stunden in Pulvermilch (Keimzahl in 1000/ml).



Graphik: Vorversuch

Wachstum der 6 *Str. lactis*-Stämme in Pulvermilch, überimpft nach 14stündiger Bebrütung.

Tabelle 1

Zeit in Min.	Stamm					
	I	II	III	IV	V	VI
0	20	18	17	16	13	8
30	27	29	33	32	22	13
60	59	51	51	43	38	18
90	93	69	64	71	53	30
120	161	123	75	86	74	42
150	240	190	96	106	101	79
180	360	310	110	180	170	100
240	1200	970	240	740	420	150
300	3300	3500	760	2300	1100	360

Kommentar zum Vorversuch

Die 6 Str.lactis-Stämme, an Pulvermilch adaptiert und mit Anfangskeimzahlen von 8000–20 000 pro ml, vermehren sich in Pulvermilch in der logarithmischen Vermehrungsphase, nach einer Bebrütung von 14 Stunden bei 30 °C.

Die Wachstumskurven der Stämme I, II, IV, V und VI verlaufen ziemlich steil und fast parallel. Stamm III zeigt von der ersten bis zur vierten Stunde eine geringe Hemmung, die aber innerhalb des Methodenfehlers liegt.

Die Generationsdauer der einzelnen Stämme in Pulvermilch betrug:

Stamm I 40–45 Minuten

Stamm II 40–45 Minuten

Stamm III . . . 62 Minuten

Stamm IV . . . 40–45 Minuten

Stamm V 48 Minuten

Stamm VI . . . 55 Minuten

Auf Grund der Vorversuche konnte in den Hauptversuchen die Schwankung der gewünschten Anfangskeimzahl bei der Überimpfung innerhalb einer Potenz gehalten werden.

4.4 HAUPTVERSUCH

Aus den Ergebnissen der Vorversuche und den Versuchen von WALSER konnte die Zeit für die Anzüchtung der 6 Str.lactis-Stämme festgelegt werden.

Die Str.lactis-Stämme, die WALSER verwendet hatte, wurden ungefähr 16 Stunden vor Versuchsbeginn aus geronnener in frische Pulvermilch überimpft und anschließend bebrütet.

Bei meinen Hauptversuchen erwies es sich am vorteilhaftesten, 15 Stunden vor Versuchsbeginn die 6 Str.lactis-Stämme aus geronnener auf frische Pulvermilch zu überimpfen und dann in den Wärmeschrank zu stellen.

Nach dieser Bebrütungszeit wurde diese Pulvermilchkultur 10000fach verdünnt, auf Rohmilch überimpft und zur Adaption der Keime wieder 4 Stunden lang bebrütet.

Aus den Versuchen von WALSER dürfen wir schließen, daß nach dieser Zeit die Keime die logarithmische Vermehrungsphase erreicht haben.

Nachfolgendes Schema veranschaulicht den endgültigen Arbeitsablauf der Hauptversuche:

1. Die 6 *Str. lactis*-Stämme werden in Pulvermilch 15 Stunden lang bei 30 °C angezüchtet.
2. Sie werden darauf 4 Stunden lang an Rohmilch adaptiert.
3. Anschließend werden sie auf die Rohmilch und die Frischmilch der gleichen Kuh überimpft.
4. Die Keimzahl wird halbstündlich bis zu einer Bebrütungszeit von 4 Stunden und dann nochmals nach 5 Stunden ermittelt.

Auf diese Weise wurde die Forderung erfüllt, daß die zur Prüfung auf Bakterizidie verwendeten Bakterien sich im Moment, wo sie in die Milch überimpft wurden, in der maximalen Entwicklungsphase befanden und zudem bereits an das Nährsubstrat adaptiert waren.

Tabelle 2

Zeit in Min.	Stamm I Milch		Stamm II Milch		Stamm III Milch		Stamm IV Milch		Stamm V Milch		Stamm VI Milch	
	roh	frisch	roh	frisch	roh	frisch	roh	frisch	roh	frisch	roh	frisch
0	17	14	10	22	4	3	5	5	6	6	3	3
30	20	15	16	21	5	4	6	6	6,6	6,3	3,5	3
60	30	24	22	25	6	5	7	6,6	7,0	7,0	4	3,5
90	50	40	31	30	7	6	11	8	8	8	5	5
120	98	60	59	47	12	8	19	11	15	11	12	10
150	192	150	114	113	22	13	29	22	26	18	24	14
180	460	360	420	230	39	30	65	39	56	30	51	36
240	2100	1800	1800	960	80	110	110	140	190	60	190	150
300	6500	5800	7400	2800	340	270	270	580	270	600	1560	600

4.4.1 Das Verhalten verschiedener Stämme von *Str. lactis* in der Milch einzelner Kühe

Versuch 1: 12.2.1964, Kuh Stella

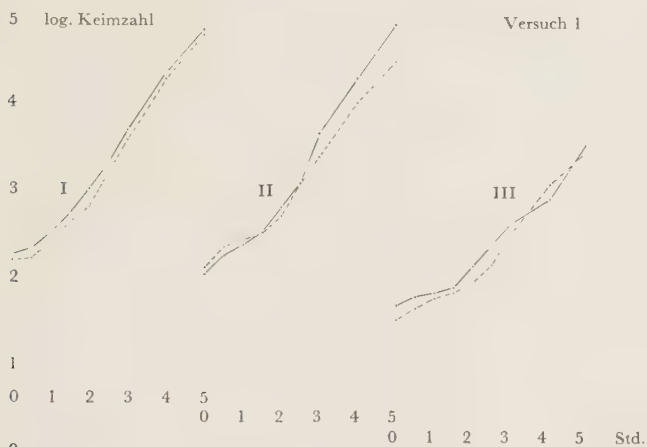
Teststämme: *Str. lactis*, Stämme I–VI

Adaption: auf Rohmilch vom Vortag während

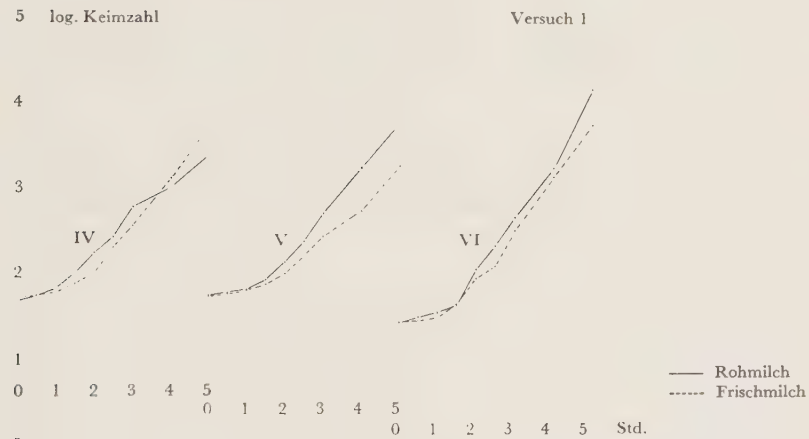
Bebrütung von 4 Stunden bei 30 °C

Beimpfungsverdünnung: 10^{-4}

Keimvermehrung bei 30°C während 5 Stunden in Rohmilch (24 Std.) und Frischmilch (Keimzahl in 1000/ml).



Graphik 1 a. Stamm I-III



Graphik 1 b. Stamm IV-VI

Kommentar zu Versuch 1

Str. lactis-Stämme I, II, III, IV, V, VI, an Rohmilch adaptiert, wachsen in Rohmilch und Frischmilch ohne erkennbare bakterizide Phase. Bei Stamm IV ist bei Frischmilch eine gewisse Hemmung in der Keimvermehrung bis 2 Stunden nach der Beimpfung zu erkennen. Im übrigen verlaufen sämtliche 6 Kurvenpaare parallel. Bei den Kurvenpaaren II, III und IV überschneidet die Frischmilchkurve die Rohmilchkurve zwischen der 3. und 4. Stunde.

Versuch 2: 3.2.1964, Kuh Scheck

Teststämme: Str.lactis-Stämme I–VI

Adaption: auf Rohmilch vom Vortag während

Bebrütung von 4 Stunden bei 30 °C

Beimpfungsverdünnung: 10^{-4}

Keimvermehrung bei 30 °C während 5 Stunden in Rohmilch (24 Std.) und Frischmilch (Keimzahl in 1000/ml).

Tabelle 3

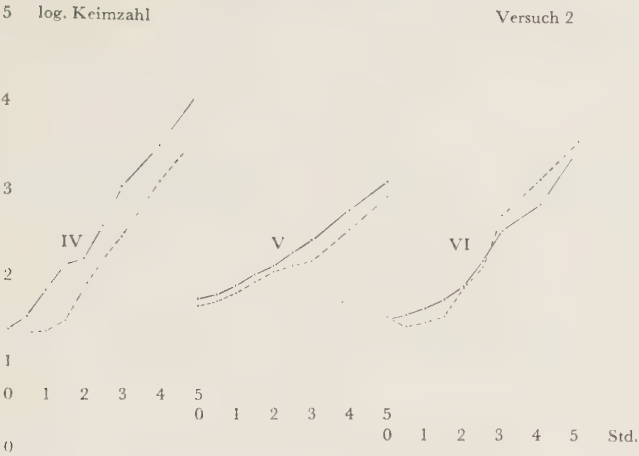
Zeit in Min.	Stamm I Milch		Stamm II Milch		Stamm III Milch		Stamm IV Milch		Stamm V Milch		Stamm VI Milch	
	roh	frisch	roh	frisch	roh	frisch	roh	frisch	roh	frisch	roh	frisch
0	5	5	0,7	1,1	4	6	2	2	5	4	3	3
30	9	7	1,4	1,3	6	6	3	2	5,6	4,8	3,4	2,5
60	18	12	2,4	1,6	9,7	6,4	6	2	7	5,9	4	3
90	34	19	3,8	2,4	12	6,7	12	3	9,7	7,8	5	3
120	51	34	6,9	3,4	15	11	14	6,7	12	10	7	7
150	112	59	12	6	26	18	34	14	17	12	14	12
180	440	100	30	10	38	31	97	26	24	14	32	48
240	1730	3200	94	49	66	52	290	113	54	32	64	124
300	7200	9500	360	110	140	140	1140	370	110	80	280	340

Kommentar zu Versuch 2

Str.lactis-Stämme I–VI, an Rohmilch adaptiert und mit Anfangskeimzahl 700 bis 6000/ml, vermehren sich in Rohmilch und Frischmilch ohne erkennbare bakterizide Phase.



Graphik 2 a. Stamm I–III



Bei Stämmen III, IV und VI kann eine gewisse Hemmung bis zu 2 Stunden Aufbewahrung festgestellt werden; jedoch findet schon nach 2,5 Stunden eine Annäherung, bzw. sogar eine Überschneidung der Kurvenpaare statt.

Im ganzen gesehen, verlaufen sämtliche 6 Kurvenpaare ziemlich parallel; die geringgradigen Unterschiede liegen innerhalb der Variationen der Keimzahlbestimmungsmethode; sie sind nicht auf Einflüsse der Milchart zurückzuführen.

Versuch 3: 4.2.1964, Kuh Krone
Teststämme: Str.lactis-Stämme I-VI
Adaption: auf Rohmilch vom Vortag während
Bebrütung von 4 Stunden bei 30 °C
Beimpfungsverdünnung: 10⁻⁴

Tabelle 4

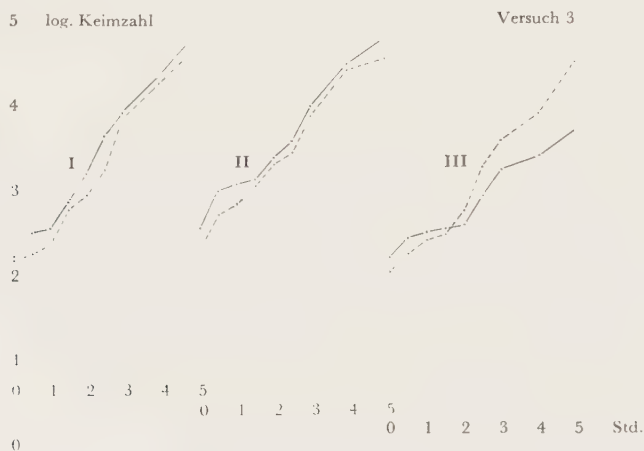
Zeit in Min.	Stamm I Milch		Stamm II Milch		Stamm III Milch		Stamm IV Milch		Stamm V Milch		Stamm VI Milch	
	roh	frisch	roh	frisch	roh	frisch	roh	frisch	roh	frisch	roh	frisch
0	16	14	31	18	12	8	5	3	3	3	3	2
30	31	17	84	44	20	13	8	4,6	5,4	5,7	4	4
60	34	22	99	57	24	19	10	5,8	6	7	4,5	5,8
90	69	56	110	92	26	22	19	8	7	10	10	7,4
120	148	81	199	162	28	41	41	15	12	13	14	8,7
150	400	160	300	220	61	130	59	21	21	15	46	14
180	770	630	760	580	122	261	80	39	38	36	67	41
240	1990	1590	2300	1960	170	520	110	75	84	76	230	180
300	5800	3900	4400	2600	340	2040	490	340	180	380	570	630

Keimvermehrung bei 30 °C während 5 Stunden in Rohmilch (24 Std.) und Frischmilch (Keimzahl in 1000/ml)

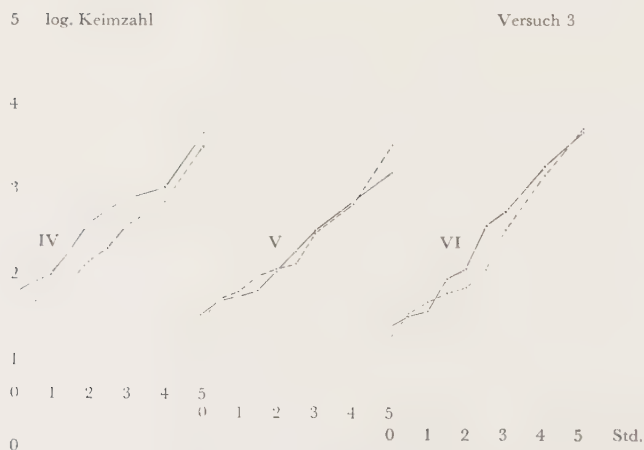
Kommentar zu Versuch 3

Die *Str.lactis*-Stämme I–VI, an Rohmilch adaptiert, vermehren sich in Rohmilch und Frischmilch ohne erkennbare bakterizide Phase. Die gegenüber Versuchen 1 und 2 erhöhte Anfangskeimzahl der Stämme I, II, III hatte keinen Einfluß auf das Kurvenbild.

Der Vergleich der Keimvermehrung in der Roh- und Frischmilch zeigte auch in diesem Versuch weitgehend übereinstimmende Resultate.



Graphik 3 a. Stamm I–III



Graphik 3 b. Stamm IV–VI

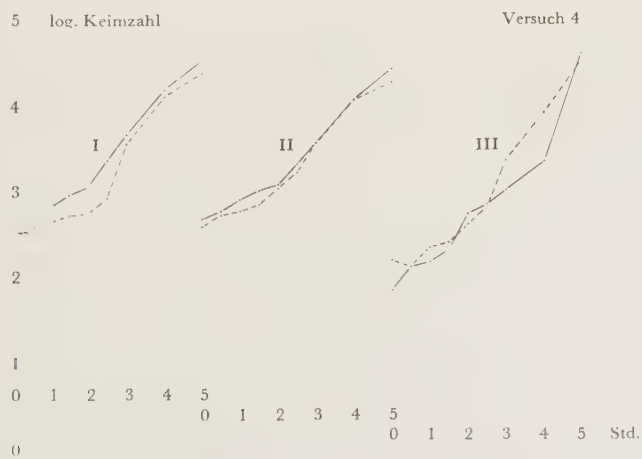
Versuch 4: 5.2.1964, Kuh Miggi
Teststämme: Str.lactis-Stämme I–VI
Adaption: auf Rohmilch vom Vortag während
 Bebrütung von 4 Stunden bei 30 °C
Beimpfungsverdünnung: 10⁻⁴
Keimvermehrung bei 30 °C während 5 Stunden in Rohmilch (24 Std.) und
 Frischmilch (Keimzahl in 1000/ml).

Tabelle 5

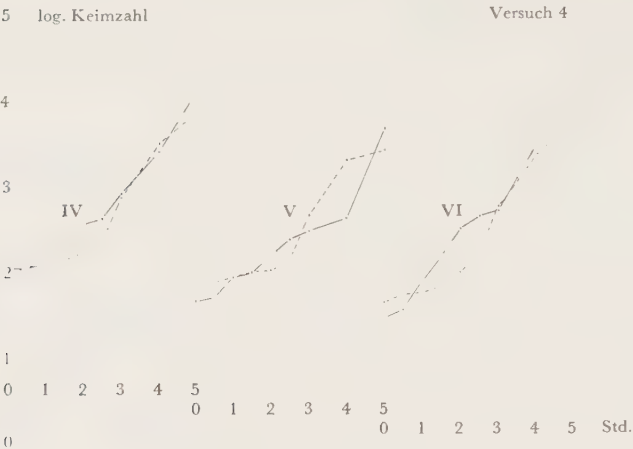
Zeit in Min.	Stamm I Milch		Stamm II Milch		Stamm III Milch		Stamm IV Milch		Stamm V Milch		Stamm VI Milch	
	roh	frisch	roh	frisch	roh	frisch	roh	frisch	roh	frisch	roh	frisch
0	27	26	38	40	5	12	12	10	5	5	3	5
30	28	28	47	42	10	10	12	13	6	8	4	6,5
60	54	36	64	47	11	17	13	13	10	10	9	6,8
90	72	43	82	56	16	19	21	15	11	11	18	8
120	92	45	96	85	43	32	41	19	18	11	39	12
150	189	68	164	130	54	51	47	25	28	16	55	20
180	370	290	290	290	79	178	93	84	35	54	64	72
240	1240	1020	940	920	170	620	290	370	50	240	390	290
300	2700	1900	2100	1450	3000	2500	1060	860	570	320	1620	690

Kommentar zu Versuch 4

Die Zunahme der Keimzahl der an Rohmilch adaptierten 6 Str.lactis-Stämme erfolgt sofort nach der Einimpfung in den zwei Nährsubstraten Roh- und Frischmilch.



Graphik 4 a. Stamm I–III



Graphik 4 b. Stamm IV-VI

Die Anfangskeimzahlen liegen hier zwischen 3400 und 40000 pro ml, der Kurvenverlauf ist aber durch diese Differenz nicht beeinflußt.

Stämme I, IV und VI zeigen bis 2 ½ Stunden eine Hemmung des Wachstums bei Frischmilch.

Spätestens ab der dritten Stunde treffen sich bei allen 6 Stämmen die Kurven und laufen gleichgerichtet weiter. Es ist keine bakterizide Phase zu erkennen.

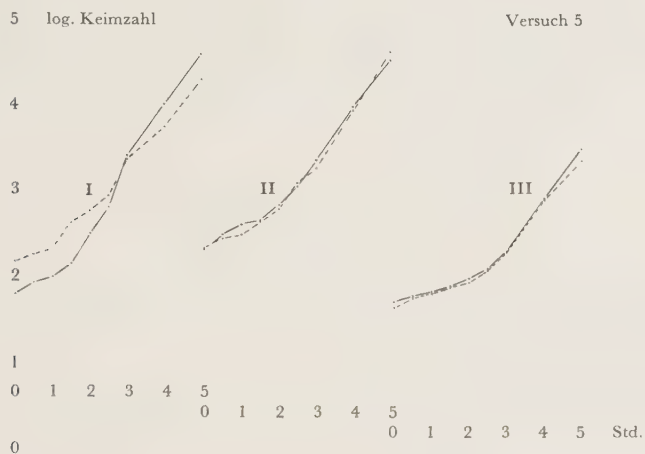
Versuch 5: 6.2.1964, Kuh Blanka
Teststämme: Str.lactis, Stämme I-VI
Adaption: auf Rohmilch vom Vortag, während
Bebrütung von 4 Stunden bei 30 °C

Tabelle 6

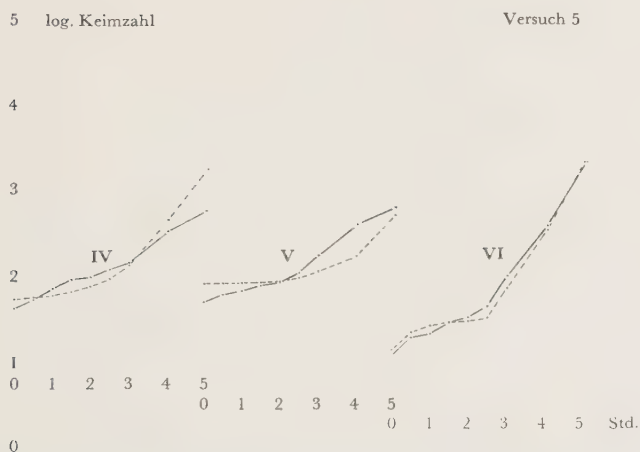
Zeit in Min.	Stamm I Milch		Stamm II Milch		Stamm III Milch		Stamm IV Milch		Stamm V Milch		Stamm VI Milch	
	roh	frisch	roh	frisch	roh	frisch	roh	frisch	roh	frisch	roh	frisch
0	6	15	19	20	4,5	3,8	4	5	5	8	1,5	1,8
30	8,6	18	29	26	5,2	4,9	5	5	5	9	2,5	2,9
60	10	21	38	28	5,8	5,5	6,8	5,7	7,5	9	2,8	3,5
90	14	42	42	39	6,7	6,5	9	6,4	9	9,6	4	4
120	31	57	61	55	8,2	7,3	9,5	7,5	9	10	4,5	4,1
150	62	84	100	110	10	10	12	9,3	12	11	6	5
180	240	220	200	160	16	16	14	13	20	13	14	10
240	940	510	820	740	67	64	35	47	49	21	56	48
300	3500	1800	2800	3400	240	180	62	189	78	64	320	350

Beimpfungsverdünnung: 10^{-4}

Keimvermehrung bei 30°C während 5 Stunden in Rohmilch (24 Std.) und Frischmilch (Keimzahl in 1000/ml).



Graphik 5 a. Stamm I-III



Graphik 5 b. Stamm IV-VI

Kommentar zu Versuch 5

Aus Tabelle 6 und Graphik 5 lassen sich nur geringfügige Unterschiede in der Bakterienvermehrung zwischen Roh- und Frischmilch erkennen. Dieser Versuch zeigt bei sämtlichen Kurvenpaaren die deutlichste Kongruenz. Stamm I beginnt mit höheren Anfangskeimzahlen bei der Frischmilch gegenüber der

Rohmilch. Er vermehrt sich aber dann etwas langsamer, so daß der Vorsprung nach 3 Stunden ausgeglichen ist. Der Kurvenverlauf dieses Versuches läßt überhaupt keine Hemmung im Keimwachstum irgendeines Stammes erkennen.

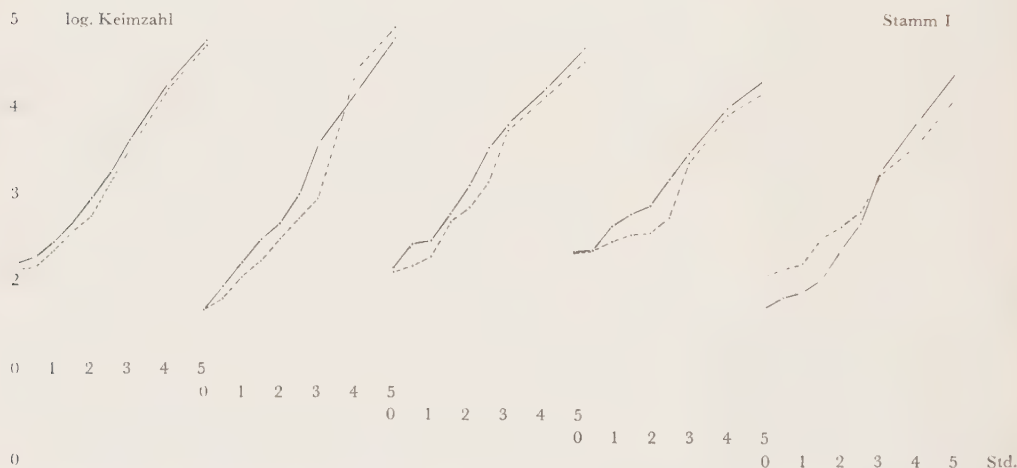
Ergänzend zu den Versuchen 1–5 läßt sich sagen:

In den 5 Versuchen war das Keimwachstum der 6 *Str. lactis*-Stämme in der Frischmilch mit wenigen Ausnahmen nur geringfügig unter demjenigen der Rohmilch. Die Variationsbreite aber ist so geringgradig, daß man daraus keine Schlüsse ziehen darf. In einzelnen Fällen steigt sogar die Kurve der Frischmilch steiler als diejenige der Rohmilch.

4.4.2 Das Verhalten einzelner Stämme von *Str. lactis* in der Milch verschiedener Kühe

Von besonderem Interesse war die Frage, ob die Milch von verschiedenen Kühen in annähernd gleichem oder aber in verschiedenem Grad mit bakteriziden Fähigkeiten ausgestattet ist.

Die nachfolgenden Graphiken (Stämme I–VI) ergeben ein Bild über das Verhalten einzelner Stämme in der Milch von verschiedenen Kühen.



Graphik 6. Stamm I: Beimpfung der Milch von den 5 Kühen Stella, Scheck, Krone, Miggi, Blanka mit *Str. lactis* 1605.

Kommentar zu Graphik 6, Stamm I

Hier sind fünf Kurvenpaare dargestellt, die das Wachstum des Stammes I (*Str. lactis* 1605) in der Milch von den Kühen I–V, Stella, Scheck, Krone, Miggi und Blanka zeigen. Die Anfangskeimzahlen des Stammes I liegen zwischen 5000 bis

27 000. Alle Kurvenpaare zeigen einen verhältnismäßig steilen Verlauf, also ein sofortiges starkes Keimwachstum.

Bei Kuh IV, Miggi, kann in den ersten Stunden von einer geringen Hemmung des Keimwachstumes gesprochen werden, doch nach 2 Stunden ist das Keimwachstum in die logarithmische Vermehrungsphase eingetreten.

Unterschiede zwischen den einzelnen Kühen, abgesehen von diesen kleinen Abweichungen, können nicht festgestellt werden; die Kurvenpaare verlaufen einheitlich und fast parallel.



Graphik 7. Stamm II: Beimpfung der Milch von den 5 Kühen Stella, Scheck, Krone, Miggi, Blanka mit *Str.lactis* 1604.

Kommentar zu Graphik 7, Stamm II

Aus dieser Graphik, die mit ziemlich gleichen Anfangskeimzahlen im Bereich von 700–40 000/ml, außer bei der Kuh II, Scheck, beginnt, geht hervor, daß nach der Beimpfung mit dem Stamm II (*Str.lactis* 1604) die Keimvermehrung sehr rasch einsetzt. Eine bakterizide oder eine stationäre Phase ist ebensowenig zu erkennen, wie Unterschiede zwischen den verschiedenen Milchen.

Kommentar zu Graphik 8, Stamm III

In dieser Gegenüberstellung, die das Keimwachstum des Stammes III (1266) in verschiedenen Milchen zeigt, sind kaum Unterschiede zwischen den verschiedenen Kühen festzustellen.

Das Keimwachstum verläuft nach der Einimpfung bei sämtlichen fünf Kurvenpaaren ziemlich linear.

Bei der Kuh IV, Miggi, zeigt zwar das Keimwachstum der Frischmilch eine anfängliche Hemmung bis zu 1 ½ Stunden, der weitere Verlauf aber läßt keine Differenzen mehr erkennen.



Graphik 8. Stamm III: Beimpfung der Milch von den 5 Kühen Stella, Scheck, Krone, Miggi, Blanka mit *Str. lactis* 1266.



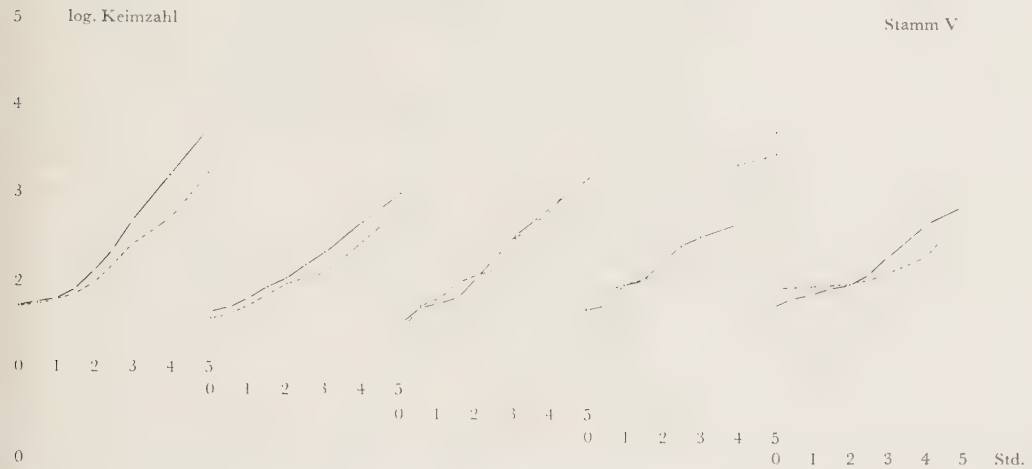
Graphik 9. Stamm IV: Beimpfung der Milch von den 5 Kühen Stella, Scheck, Krone, Miggi, Blanka mit *Str. lactis* 1503.

Kommentar zu Graphik 9, Stamm IV

In dieser Graphik sind die Wachstumskurven des Stammes IV (*Str. lactis* 1503) in verschiedenen Milchen dargestellt.

Nur in der Frischmilch von Kuh II (Scheck) zeigt sich während 1 ½ Stunden nach der Impfung eine Hemmung der Keimvermehrung, nicht aber eine Abnahme der Keimzahl. In diesem Falle könnte man von einer ganz kurzfristigen

hemmenden Wirkung der Frischmilch im Vergleich zur gelagerten Rohmilch sprechen. In der Milch der anderen 4 Kühe ist jedoch diese Erscheinung nicht zu beobachten.



Graphik 10. Stamm V: Beimpfung der Milch von den 5 Kühen Stella, Scheck, Krone, Miggi, Blanka mit *Str. lactis* 1268.

Kommentar zu Graphik 10, Stamm V

Die Graphik zeigt das Wachstum des Stammes V (*Str. lactis* 1268) in der Milch der fünf verschiedenen Kühe. Die Anfangskeimzahlen liegen hier bei sämtlichen Milcharten im gleichen Bereich (zwischen 3000 und 8000 Keimen/ml).

Bei Kuh Stella zeigt sich sowohl bei der Roh- wie der Frischmilch in den ersten 2 Stunden eine etwas verzögerte Keimzahlzunahme. Auffallend ist ferner das relativ langsame Wachstum dieses Stammes in der Milch der Kuh Blanka. Wesentliche Unterschiede der Keimvermehrung in Roh- und Frischmilch sind jedoch bei diesem Stamm nicht erkennbar.

Kommentar zu Graphik 11, Stamm VI

Der Vergleich der Keimvermehrung des Stammes VI (*Str. lactis* 1194) in fünf verschiedenen Milchen zeigt weitgehend übereinstimmende Resultate.

Die Anfangskeimzahlen liegen auch bei diesem Stamm nicht weit auseinander, nämlich zwischen 1500 und 5000 Keimen/ml.

Analog wie bei Stamm IV sehen wir in der Milch der Kuh Scheck wiederum im Vergleich zur Rohmilch eine Hemmung der Keimvermehrung während ca. 1 ½ Stunden. In der Milch der anderen Kühe verlaufen jedoch die Vermehrungskurven weitgehend parallel und ohne erkennbare Anzeichen einer hemmenden

oder bakteriziden Phase. Der etwas flachere Verlauf der Kurven während der ersten Stunde nach der Impfung kann kaum als spezifische Hemmung angesprochen werden.



Graphik 11. Stamm VI. Beimpfung der Milch von den 5 Kühen Stella Scheck, Krone, Miggi, Blanka mit Str.lactis 1194.

4.4.3 Zusammenstellung der Ergebnisse

Verschiedene Stämme von Streptococcus lactis, auf Rohmilch adaptiert. Vergleich der Keimvermehrung in Roh- und Frischmilch.

Milch der Kuh	Stamm Str.lact.	eingepfzte Keime in Tausend pro ml	Wachstum in	
			Rohmilch	Frischmilch
Stella	I	14 -17	+++	+++
	II	10 -12	+++	+++
	III	3 - 4	±/++	±/++
	IV	5	±/++	±/++
	V	6	±/++	±/+
	VI	3	±/++++	±/++++
Scheck	I	5	+++	+++
	II	0,7- 1,1	++	++
	III	4 - 6	±/+	±/+
	IV	2	++	±/++
	V	4 - 5	±/+	±/+
	VI	3	±/++++	±/++++

Milch der Kuh	Stamm Str.lact.	eingepfzte Keime in Tausend pro ml	Wachstum in	
			Rohmilch	Frischmilch
Krone	I	14 -16	±/+++	±/+++
	II	18 -31	++	++
	III	8 -12	±/++	±/++
	IV	3 - 5	++	++
	V	3	±/++	±/++
	VI	2 - 3	+++	+++
Miggi	I	26 -27	±/+++	±/+++
	II	38 -40	±/++	±/++
	III	5 -12	±/+++	±/+++
	IV	10 -12	±/+++	±/+++
	V	5	±/++	±/++
	VI	3 - 5	±/+++	±/+++
Blanka	I	6 -15	±/+++	±/+++
	II	19 -20	±/+++	±/+++
	III	3,8- 4,5	±/++	±/++
	IV	4 - 5	±/++	±/++
	V	5 - 8	±/+	±/+
	VI	1,5- 1,8	±/+++	±/+++
Stationäre Keimzahl	±	Anfangs stationäre Keimzahl,		
Schwache Vermehrung	+	später schwache, mittlere,		
Mittlere Vermehrung	++	starke Vermehrung	±/+	++ +++
Starke Vermehrung	+++			

5. DISKUSSION UND SCHLUSSFOLGERUNGEN

Beim vergleichenden Betrachten der Kurven fällt auf, daß zwar in einzelnen Fällen die Keimzahlkurve der Frischmilch in den ersten 1-1 ½ Stunden flacher verläuft als die der aufbewahrten Rohmilch. In der Regel sind die Differenzen aber nicht außerhalb der Methodengrenzen und korrigieren sich schon nach 2-3 Stunden, so daß wir es nicht wagen, von einer spezifischen echten Hemmung zu sprechen.

Eine 1-1 ½ Stunden dauernde stationäre Phase findet sich auffallenderweise bei zwei Stämmen in der Milch der Kuh Scheck und bei einem dritten Stamm ist die Keimzahl in der Milch der gleichen Kuh sogar leicht rückläufig und erst nach anderthalb Stunden wieder auf der Höhe der Einsaat. Noch im Verlauf der zweiten Stunde steigt aber die Kurve deutlich an und verläuft von da an ebenso steil (Stamm IV) oder steiler (Stämme III und VI) als die Keimzahlkurve der

Rohmilch, so daß in zwei der drei Fälle die Bakterienmenge in der Frischmilch diejenige in der Rohmilch erreicht oder zeitweise übertrifft.

Die übrigen Stämme zeigen in der frischen und gelagerten Milch der gleichen Kuh keine wesentliche Differenz im Wachstum, und umgekehrt erweisen sich die in der Milch von «Scheck» leicht gehemmten Stämme in den übrigen Milchen als ebenso wachstumsfreudig wie alle anderen.

In Anbetracht der auch bei sorgfältiger Arbeitsweise in der Methodik liegenden Fehlergrenzen möchten wir deshalb den beobachteten Differenzen keine große Bedeutung beimessen.

Im Vorversuch fiel auf, daß die Generationsdauer der verschiedenen geprüften Keime in der Pulvermilch nicht kürzer war, als in der frischen oder der aufbewahrten Rohmilch, wie wir das nach früheren Untersuchungen hätten erwarten müssen. Wir entnehmen daraus vor allem, daß sich Versuche, die nicht streng parallel durchgeführt worden sind, in ihren Ergebnissen nicht ohne weiteres vergleichen lassen. Unterschiede in der Generationsdauer zeigen sich bei den verschiedenen Kühen auch innerhalb der einzelnen Stämme. In Pulvermilch und in der Milch von vier der fünf Kühe erwies sich der Stamm I als der wachstumsfreudigste, während der Stamm V bei allen Tieren, nicht aber in Pulvermilch, die längste Generationsdauer aufwies. Bei keinem Stamm war aber die Vermehrung in der frischen Milch durchwegs langsamer als in der aufbewahrten.

Die Tatsache, daß die uns zur Verfügung stehenden Kühe in verschiedenem Alter und in verschiedenen Laktationsstadien standen, erlaubt es, auch kurz einzugehen auf die Frage des Keimwachstums in neumelker, mittelmelker oder altmelker Milch, oder in Milch von jungen und älteren Kühen. Die Keimentwicklung in der altmelken Milch der Kühe Miggi und Krone war gleich gut wie diejenige in der Milch der Kuh Stella, welche im neumelken Stadium war. Etwas schlechter, aber auch nicht durchwegs unterdurchschnittlich, war die Keimvermehrung bei der mittelmelken Kuh Blanka. Ein Einfluß des Laktationsstadiums auf die Bakterienentwicklung in der Milch läßt sich aus diesen Einzelergebnissen nicht entnehmen. Auch ein Zusammenhang zwischen Alter der Kühe und Keimwachstum in der Milch besteht in unseren Fällen nicht. Von den beiden jungen Kühen Blanka und Stella zeigte sich in der einen Milch ein gutes, in der anderen ein etwas behindertes Keimwachstum. Die Milch der alten Kühe Scheck, Krone und Miggi bot den Keimen gute Entwicklungsmöglichkeiten.

Die Zahl der in die Milch eingimpften Keime, welche allerdings nur innerhalb der Potenzen 10^2 – 10^4 pro ml variierte, wirkte sich auf die Generationsdauer nicht aus. Geringe und große Entwicklungsgeschwindigkeiten fanden wir bei schwacher und massiverer Keimeinsaat.

Die Hauptfrage, die wir uns gestellt haben, kann nach den Untersuchungsergebnissen wie folgt beantwortet werden: Gegenüber den bereits an Rohmilch

adaptierten Lactis-Streptokokken, denen die Milch als natürliches Nährmedium optimale Wachstumsbedingungen bietet, war in der aseptisch entnommenen Milch verschiedener Kühe mit gesunden Eutern eine keimabtötende Eigenschaft, das heißt eine eigentliche Bakterizidie nicht nachweisbar. Die frischgewonnene Milch bot den eingepflichten Organismen die gleichen Entwicklungsmöglichkeiten, wie die Milch der gleichen Kühe nach einer Aufbewahrung während 24 Stunden. Die durchschnittliche Generationsdauer in den ersten 4 bis 5 Stunden der Bebrütung bei 30 °C war in der frischen Milch nicht länger als in der aufbewahrten. Eine Hemmung des Keimwachstums innerhalb der ersten Zeit nach dem Melken konnte bei fünf verschiedenen Kühen und bei sechs verschiedenen Stämmen von *Streptococcus lactis* nicht nachgewiesen werden.

Einschränkend ist festzustellen, daß wir nur die Milch von Kühen prüften, welche unter einheitlichen Haltungs- und Fütterungsverhältnissen standen, so daß unterschiedliche Einflüsse von dieser Seite aus nicht berücksichtigt sind.

Auf Grund der Versuchsergebnisse kommen wir zur *Schlußfolgerung*, daß eine eigentliche bakterizide Wirkung von Kuhmilch auf die Bakterienart *Streptococcus lactis* nicht besteht, und daß kein Unterschied in der Keimvermehrung in keimfreier frischer gegenüber der 24 Stunden gelagerten Milch festzustellen ist.

Wir können damit die vorangegangene Arbeit von WALSER [38] bestätigen und dahin erweitern, daß das von ihm bei der Milch einer einzelnen Kuh beobachtete Fehlen eines bakteriziden Effektes nicht nur der Individualität des Versuchstieres zugeschrieben werden kann, und daß es nicht nur für einzelne, sondern für alle uns zur Verfügung stehenden Stämme von *Streptococcus lactis* gilt.

Es ist deshalb wenig wahrscheinlich, daß die in der Literatur oft, aber durchaus nicht immer beobachtete Keimhemmung in der frischen Rohmilch auf spezifische bakterientötende Substanzen, die zum normalen Milchgehalt gehören, zurückgeführt werden kann.

Dafür müssen eher die in der Literaturbesprechung bereits diskutierten sekundären Einflüsse verantwortlich gemacht werden.

Als solche nennen wir zusammenfassend nochmals:

- Immunstoffe oder Leukozyten in der Milch erkrankter oder infizierter Kühe und Euter,
- Übertritt von Stoffwechselprodukten oder Futtersubstanzen in die Milch,
- mangelnde Adaption der Keime an das Nährmilieu Milch,
- der Bakterienflora nicht zusagende Temperaturverhältnisse,
- anti- oder symbiotische Wirkung einzelner Bakterienarten in dem normalerweise gemischten Keimbestand,
- Wirkung von Bakteriophagen,
- Veränderung von Milchbestandteilen durch Hitzewirkung oder Bakterientätigkeit.

Verschiedene der genannten Faktoren können sich hemmend oder fördernd auf das Keimwachstum auswirken, so daß der Schlußeffekt von einer ganzen Reihe positiver und negativer Einflüsse abhängig ist. Damit erklärt sich ein guter Teil der widersprüchlichen Resultate in den vielen in der Literatur wiedergegebenen Versuchen über die Bakterizidie der Milch.

6. ZUSAMMENFASSUNG

1. Unter Bakterizidie der Milch versteht man eine keimtötende Kraft der Frischmilch, die vor allem in der ersten Zeit nach dem Melken zu einem Keimrückgang, mindestens aber zur Hemmung im Keimwachstum führt.

Die Frage, ob tatsächlich keimfeindliche Stoffe in der Milch enthalten seien, ist praktisch wichtig, weil die Behandlung der Milch nach dem Melken abhängt von der zu erwartenden Keimvermehrung.

In der Anstalt Liebfeld wird deswegen im Rahmen einiger Arbeiten geprüft, ob eine eigentliche Bakterizidie der Milch tatsächlich nachweisbar sei, oder ob sich die vielfach beobachtete anfängliche Keimhemmung auf andere Art erklären lasse.

Die in dieser Veröffentlichung geschilderten Versuche sind ein Ausschnitt aus diesem Forschungsgebiet.

2. Eine Literaturzusammenfassung orientiert über die zahlreichen bisherigen Arbeiten, welche recht oft zu widersprüchlichen und unklaren Ergebnissen gekommen sind.

3. Untersucht wurde in Parallelversuchen, ob frische, keimfrei entnommene Milch (Frischmilch) von 6 gesunden Kühen mit gesunden und von Infektionen freien Eutern den Milchsäurestreptokokken (*Str. lactis*) weniger gute Entwicklungsbedingungen biete, als die Milch derselben Tiere nach einer Aufbewahrungszeit von 24 Stunden (Rohmilch).

4. Es wurden sechs verschiedene *Str. lactis*-Stämme aus der Sammlung des bakteriologischen Institutes der Versuchsanstalt Liebfeld geprüft.

5. Die Keime wurden zuerst bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase in Rohmilch adaptiert und dann in verschiedenen Mengen parallel auf keimfreie Rohmilch und keimfreie Frischmilch überimpft.

Durch kulturelle Keimzahlbestimmung auf der Platte wurde die Keimvermehrung bei 30 °C während den ersten fünf Stunden ermittelt und in Tabellen und graphisch aufgezeichnet.

Es ergaben sich folgende Resultate:

- 5.1 Das Keimwachstum war in frischer und aufbewahrter Milch von Anfang an praktisch gleich gut. Ein Unterschied, der auf keimfeindliche Stoffe in der Frischmilch hinweisen würde, war nicht feststellbar.
- 5.2 In der Regel ergab sich eine geringe anfängliche Wachstumshemmung, obschon die Keime bereits auf Rohmilch adaptiert waren. Diese Phase war aber bei der frischen und der aufbewahrten Milch ungefähr gleich.
- 5.3 Unterschiede im Keimwachstum, welche auf die Individualität der fünf geprüften Kühe zurückgeführt werden könnten, waren nicht erkennbar.
- 5.4 Dagegen verhielten sich einzelne Bakterienstämme in allen Milchproben mehr oder weniger wachstumsfreudig.
- 5.5 Ein Einfluß der Impfmenge auf den Verlauf der Wachstumskurven war in den Versuchen nicht zu erkennen. Eingepflicht wurden dabei von 700 bis 40000 Keime pro ml.
6. In der Milch von fünf gesunden Kühen mit nicht infizierten Eutern konnten gegenüber sechs verschiedenen Stämmen von *Str. lactis* bakterizide Stoffe nicht nachgewiesen werden.

6. RÉSUMÉ

Essais concernant le pouvoir bactéricide du lait cru provenant de mamelles saines non infectées

1. Par bactéricidie du lait on entend un pouvoir bactéricide du lait à l'état frais, qui, sitôt après la traite, provoque au début une diminution des germes ou tout au moins une inhibition de la multiplication.

Le lait contient-il effectivement des substances bactériostatiques? Cette question est importante du point de vue pratique, car le traitement du lait après la traite dépendra de l'accroissement des germes auquel on peut s'attendre.

Dans quelques travaux de la Station de recherches à Liebefeld, on examine, s'il est réellement possible de prouver qu'il y a bactéricidie proprement dite ou si cette inhibition initiale des germes, observée à plusieurs reprises, s'explique par d'autres causes.

Les expériences décrites dans cette publication portent sur un fragment de ce champ d'investigations.

2. Le résumé bibliographique renseigne sur les nombreux travaux effectués jusqu'ici dans ce domaine, travaux qui ont fréquemment fourni des résultats contradictoires et peu clairs.

3. Par des essais parallèles, on a cherché à savoir si du lait à l'état frais, prélevé aseptiquement sur 6 vaches saines ayant des mamelles saines et non infectées (lait frais) présentait, pour les streptocoques lactiques (*Str.lactis*), des conditions de développement moins bonnes que le lait des mêmes bêtes conservé pendant 24 heures (lait cru).

4. Six souches différentes de *Str.lactis* provenant de la collection de la division de bactériologie de la Station de recherches à Liebefeld ont été examinées.

5. Les germes ont d'abord été adaptés dans du lait cru, jusqu'à ce qu'ils aient atteint la phase de multiplication logarithmique, puis différentes doses ont été inoculées parallèlement à du lait cru et à du lait frais exempts de germes.

A l'aide du procédé de numération par culture sur plaque, on a déterminé l'accroissement des germes pendant les cinq premières heures à la température de 30 °C; cet accroissement est représenté par des tableaux et des graphiques.

On a obtenu les résultats suivants:

5.1 Dès le début, la croissance des germes a été pratiquement aussi bonne dans le lait frais que dans le lait conservé. On n'a pas constaté de différences pouvant être attribuées à des substances bactériostatiques dans le lait frais.

5.2 En général, il y a eu une faible inhibition initiale de la multiplication, bien que les germes aient été préalablement adaptés dans du lait cru. Cette phase était cependant à peu près semblable dans le lait frais et dans le lait conservé.

5.3 On n'a pas discerné de différences de croissance imputables à l'individualité des 5 vaches examinées.

5.4 Dans tous les échantillons de lait, il y eut en revanche quelques souches de bactéries qui se sont multipliées avec plus ou moins de virulence.

5.5 Les expériences n'ont par permis de déciter une influence exercée par la dose d'inoculum sur le déroulement des courbes de croissance. On a inoculé de 700 à 40 000 germes par ml.

6. Dans le lait de cinq vaches saines avec des mamelles non infectées, on n'a décelé aucune substance bactéricide avec 6 différentes souches de *Str.lactis*.

6. SUMMARY

Experiments on the bactericidal action of raw milk from healthy, not infected udders

1. Milk 'Bactericidie' means a bactericidal effect of the fresh milk which especially immediately after milking leads to a decrease of the microorganisms, at the least to the inhibition of their growth.

The question, if milk really contains bacteriostatic substances is important in practice because the treatment of the milk after milking depends on the expected germs' development.

Therefore the Institute Liebfeld is studying by several investigations to find out if a specific 'Bactericidie' of milk really is detectable or if the often observed initial germ inhibition may be explained in an other way.

The experiments described in this publication are a part of this research program.

2. A literature review informs about the former research work on 'Bactericidie' of milk which often gave contradictory and not clear results.

3. In parallel experiments it has been examined if fresh sterile raw milk (fresh milk) from 6 healthy cows with normal and germfree udders gives less favourable development conditions to lactic acid bacteria (*Str.lactis*) than 24 hours stored milk from the same animals (raw milk).

4. Six different *Str.lactis* strains from the collection of the bacteriological division of the Research Institute Liebfeld have been examined.

5. The germs have been previously adapted in raw milk till they reached the logarithmic growth phase and then parallelously transferred in different quantities on sterile raw milk and sterile fresh milk.

By means of the plate count method the growth of bacteria has been determined during the five first hours at a temperature of 30 °C and noted in tabular form and plotted.

The results are the following:

5.1 The growth of germs was from the beginning practically as good in fresh milk as in stored milk. A difference relative to bacteriostatic substances could not be detected.

5.2 There was at the beginning generally a slight growth inhibition though the germs already had been adapted to raw milk. But this phase was nearly the same for the fresh milk and for the stored one.

5.3 Differences in the germ's growth relative to the individuality of the five tested cows could not be recognized.

5.4 Some bacteria strains, on the contrary, were growing more or less in the milk samples.

5.5 An influence on the growth curves by the dose of the inoculum could not be detected. 700 to 40,000 germs per ml were inoculated.

6. In tests with six different *Str.lactis* strains in milk of five healthy cows with not infected udders no bactericidal substances could be found.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 FOKKER, A.P.: Zeitschr. f. Hyg. 9, 41 (1889).
- 2 FREUDENREICH, E. v.: Ann. de micrographie 1891, 416.
- 3 FLEISCHMANN-WEIGMANN: Lehrbuch der Milchwirtschaft, 7.Aufl. P.Parey, Berlin (1932), S. 130.
- 4 AUCLAIR, J.E. und A.HIRSCH: J.Dairy Res. 20, 45 (1953).
- 5 PORTMANN, A. und J.E.AUCLAIR: Le Lait 39, 147 (1959).
- 6 SASAKI, R. und K.AIBARA: Dairy Sci. Abst. 21, 120 (1958).
- 7 RITTER, P.: Diss. ETH Zürich 1949.

- 8 MEIER, W.: Diss. ETH Zürich, Beihefte Bot. Centralblatt, Bd. 36, Abt. I (1919).
- 9 HIPPIUS, A.: Jahrb. f. Kinderheilkde. 61, 372 (1905).
- 10 SZASZ, A.: Zeitschr. f. Fleisch- und Milchhyg. 17, 353 (1907).
- 11 RULLMANN, W. und R. TROMMSDORFF: Archiv f. Hyg. 59, 224 (1906).
- 12 SCHLÄPPI, F., Diss. ETH Zürich 1928.
- 13 HOFFMANN, S.: Diss. ETH Zürich 1931.
- 14 CHAMBERS, CH. O.: J. of Bact. 5, 527 (1920).
- 15 ZOLLIKOFER, E. und O. RICHARD: Landw. Jahrb. d. Schweiz 1943, 678.
- 16 GILLIES: Int. Milchw. Kongr. 1959, 2: 253.
- 17 KÄSTLI, P. und M. BINZ: Schweiz. Milch-Ztg. 84, Wiss. Beilage, 61 (1958).
- 18 CIBLIS: Molk. Ztg. 10, 1241 (1956).
- 19 McEWEN: Vet. Rec. 62, 27 (1950).
- 20 LESTER, J.: Bact. 76, 365 (1958).
- 21 MAXCY, R. B. und R. C. CHANDAN: J. Dairy Sci., 45, 654 (1962).
- 22 WHITEHEAD, H. R. and G. A. COX: New Zealand J. Sci. Tech. 16, 319 (1935).
- 23 DREWES, K.: Milchw. Forschg. 4, 403 (1927).
- 24 SHAYEGANI, J.: Gen. Microb. 29, 625 (1962).
- 25 PORTMANN, A. und J. E. AUCLAIR, Ann. Inst. Past. 97, 590 (1959).
- 26 LEITCH, R.: Le Lait 13, 529 (1933).
- 27 PROUTY, C. C.: J. of Dairy Sci. 23, 899 (1940).
- 28 GRABER, H.: Diss. Univ. Bern, 1953.
- 29 SEELEMANN und MURPHY: Dairy Sci. Abst. 15, 143 (1951).
- 30 HENNINGSON, R. W. und F. R. KOSIKOWSKI: J. Dairy Sci. 40, 818 (1957).
- 31 NATARAJAN, A. M. und A. T. DUDANI: Dairy Sci. Abst. 24, 398 (1962).
- 32 BUCHANAN and FULMER: Physiology and Biochemistry of Bacteria I (1928).
- 33 KOSIKOWSKI, F. R. und O'LEARY: J. Dairy Sci. 46, 89 (1963).
- 34 LABOTS, H.: Int. Milchw. Kongreß 1959, 3: 1355.
- 35 KOCK, A. L.: J. of Bact. 77, 623 (1959).
- 36 SONNENSCHNEN, C.: Giorn. Batt. e Imun. Anno II, 1927.
- 37 LÖHNIS, F.: Handbuch d. landw. Bakt., Verlag Geb. Bornträger, Berlin 1910, S. 144.
- 38 WALSER, V.: Diss. Univ. Bern 1964.
- 39 KÄSTLI, P.: Schweiz. Milchztg. 81, 594 (1955).
- 40 VIRTANEN, A. J.: Schweiz. Ztschr. Path. und Bakt. 21, 971 (1958).

Es ist dem Autor eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. Dr. P. Kästli an dieser Stelle herzlich zu danken für die Zuweisung des Themas und die immer tatkräftige, wertvolle Beratung und Mithilfe.

Die gleiche warme Dankbarkeit gebührt dem Adjunkten, Herrn Dr. Baumgartner, für seine selbstlose Unterstützung und freundliche Mitarbeit.

Dank wird nicht zuletzt auch dem Kollegen Herrn Leffler und dem technischen Personal für ihre Mithilfe geschuldet.

Eingegangen August 1964.

Lebenslauf

Ich wurde am 24. Oktober 1936 als erstes Kind der Tierarztheleute Dr. Karl Meeder und seiner Frau Christine Meeder, geborene Kraus, in Würzburg/M geboren.

In Marktbreit/M, dem Wohnort meiner Eltern, besuchte ich die Städt. Oberrealschule, an der ich im Sommer 1956 das Abitur bestand.

Im Herbst des gleichen Jahres immatrikulierte ich mich an der Universität München und beschloß die vorklinischen Semester 1958 mit dem Physikum.

Darauf siedelte ich für zwei Semester an die Tierärztliche Hochschule in Wien über.

Die letzten drei Semester meines Veterinärmedizinstudiums führten mich wieder an die Universität München. Hier beschloß ich mein Studium im Sommer 1961 mit dem Staatsexamen.

Seither haben praktische Betätigung bei verschiedenen Tierärzten in Frankreich, in der Schweiz und in Deutschland, sowie die Ausarbeitung vorliegender Dissertation meine Zeit ausgefüllt.

Im Mai 1964 habe ich mich in Marktbreit/M als praktischer Tierarzt niedergelassen, um die Praxis meines verstorbenen Vaters weiterzuführen.

